



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

RECEIVED

19 MAR 2004

WIPO

PCT

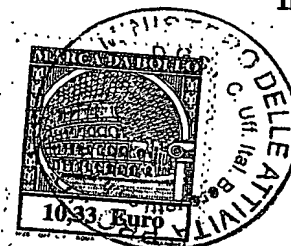
Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

N.

Invenzione Industriale

MI2002 A 002743

EP/03/14719



Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, li

08 FEB. 2004

IL DIRIGENTE

Polito
dr. Polito CALOPPO

This Page Blank (uspto)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E LA CURA DEI TUMORI codice 043763
Residenza Milano
2) Denominazione _____ codice _____
Residenza _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Bianchetti Giuseppe ed altri cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza Bianchetti Bracco Minoja s.r.l.
via Rossini n. 8 città Milano cap 20122 (prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/ci/sci) _____ gruppo/sottogruppo _____/_____/_____

"Metodo per la determinazione del rischio di comparsa, della presenza o del decorso di malattie tumorali"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA ____/____/____

N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) Sozzi Gabriella 3) _____
2) _____ 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

1) _____
2) _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 12 PROV n. pag. 19 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 2) 12 PROV n. tav. 03 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 3) 10 RIS lettera d'incarico, procura XXXXXXXXXXXX
Doc. 4) 10 RIS designazione inventore
Doc. 5) 10 RIS documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6) 10 RIS autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7) 10 nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale Euro

Duecentonovantuno/80#

obbligatorio

COMPILATO IL 123/12/2002

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Banfi PaoloCONTINUA SI/NO NODEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SICAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI MILANO MILANOcodice 1155

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI2002A 002743

Reg. A.

L'anno DUEMILADUEdel mese di DICEMBREIl(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda di brevetto di n. 90

fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprariportato.

1. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL RAPPRESENTANTE PUR INFORMATO DEL CONTENUTO DELLA CIRCOLARE N. 423 DEL 20/03/2001 EFFETTUA IL DEPOSITO CON RISERVA DI LETTERA DI INCARICO.

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE

M. CARPONEST

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA MI2002A 002743 REG. ADATA DI DEPOSITO 23/12/2002
DATA DI RILASCIO / /

D. TITOLO

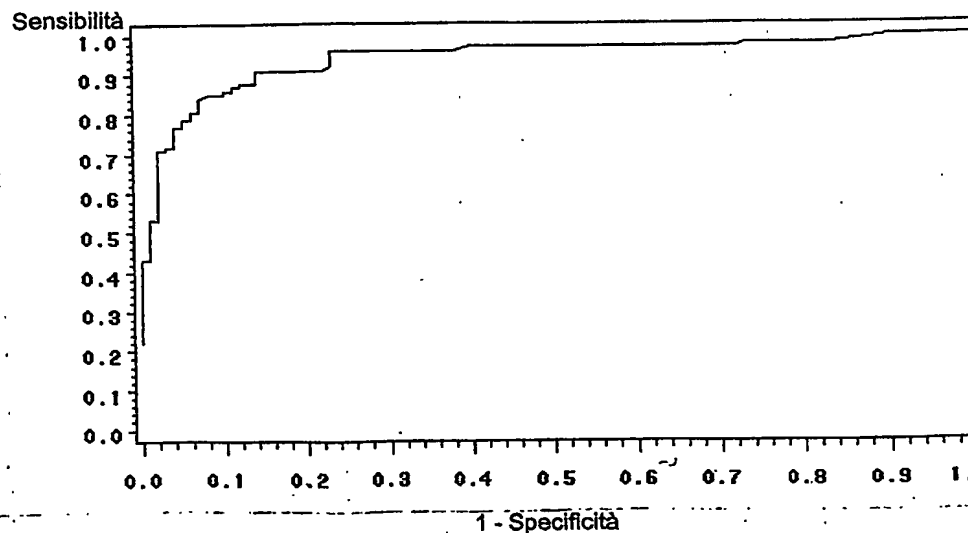
"Metodo per la determinazione del rischio di comparsa, della presenza o
del decorso di malattie tumorali"

L. RIASSUNTO

Viene descritto un metodo per la diagnosi precoce, la prognosi e il monitoraggio di malattie tumorali, o per la determinazione del livello di rischio associato allo sviluppo del tumore, basato sulla determinazione quantitativa del DNA in campioni di plasma.

M. DISEGNO

FIGURA 3

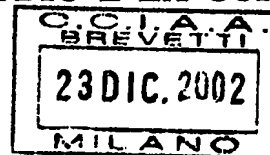


798 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

B/mc **“METODO PER LA DETERMINAZIONE DEL RISCHIO DI
COMPARSA, DELLA PRESENZA O DEL DECORSO DI MALATTIE
TUMORALI.”**

a nome : **ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E LA CURA
DEI TUMORI**

con sede in: Milano



* * *

MI 2002A 002743

La presente invenzione riguarda un metodo per la diagnosi precoce, la prognosi e il monitoraggio di malattie tumorali, o per la determinazione del livello di rischio associato allo sviluppo del tumore. Il metodo dell'invenzione è basato sulla quantificazione del DNA in campioni di plasma mediante tecniche di PCR.

TECNICA NOTA

Diverse pubblicazioni scientifiche o brevettuali descrivono metodi per determinare la presenza di malattie tumorali basati sull'identificazione di specifiche alterazioni genetiche nel DNA o nell'RNA circolante.

US5496699 descrive un saggio per rilevare mutazioni in sequenze di acido nucleico, in particolare la sequenza del gene K-ras, presenti in campioni di fluidi biologici quali sangue, siero o plasma.

US5068175 propone un metodo per la determinazione di malattie tumorali correlate all'oncogene ras in cui quest'ultimo viene quantificato a partire da campioni di siero o plasma.

WO01/42504 riporta la determinazione di acido nucleico extracellulare, per esempio DNA degli oncogeni K-ras e APC, in campioni di siero o plasma,

per la valutazione del fattore di rischio associato a diversi tipi di tumore.

WO02/18652 descrive un metodo di rivelazione quali/quantitativa dell'RNA della telomerasi e della trascrittasi inversa di telomerasi umane nel plasma o siero per la diagnosi, il monitoraggio, il trattamento o la valutazione di diverse malattie neoplastiche .

In generale, i metodi di caratterizzazione molecolare della presenza di alterazioni geniche hanno bassa sensibilità e richiedono l'analisi di un ampio pannello di marcatori genetici per ottenere un livello di informatività accettabile.

Recentemente è stato riportato un metodo per la quantificazione di DNA nudo circolante nel plasma di pazienti con cancro polmonare basato su un saggio di tipo colorimetrico, in grado di discriminare tra pazienti e soggetti sani e di determinare precocemente la ricomparsa della malattia durante il follow-up (Sozzi, G. et al., Cancer Research 61, 4675-4678, 15 giugno 2001). Tuttavia, l'uso di tecniche colorimetriche (p.es. DNA Dipstick) per la valutazione quantitativa del DNA circolante presenta dei limiti quali una linearità ristretta nell'intervallo 0.1-10 ng/ml, quindi non è molto sensibile ai valori inferiori ed inoltre la lettura del test è basata su una valutazione soggettiva.

In un lavoro più recente (Hsueh-Wei Chang et al., Journal of the National Cancer Institute, Vol. 94, No. 22, 20 novembre 2002) è stata proposta l'analisi della concentrazione del DNA o degli SNP in campioni di plasma, per la determinazione della presenza di malattia tumorale, in particolare del tumore ovarico. La quantificazione del DNA è stata eseguita mediante analisi dell'intensità di fluorescenza generata dal colorante PicoGreen® legato al DNA a doppio filamento. I risultati indicano che, a differenza dell'analisi SNP, la metodica utilizzata per la misurazione delle concentrazioni

plasmatiche di DNA è scarsamente sensibile e specifica, e pertanto non si presta allo screening della popolazione per malattie tumorali.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Oggetto dell'invenzione è un metodo per la quantificazione del DNA in un campione di plasma di un paziente neoplastico, di un soggetto con sospetta neoplasia o a rischio di sviluppo di neoplasia, che comprende i seguenti passaggi: ,

1. estrazione del DNA dal campione in esame;
2. aggiunta alla preparazione di DNA di i) una miscela di oligonucleotidi di innesco (primers) idonei all'amplificazione PCR di un frammento del gene della trascrittasi inversa di telomerasi umana (hTERT), e di ii) un oligonucleotide sonda (probe), recante almeno un fluoroforo "quencher" e uno "reporter" alle estremità 3' e 5', in grado di appaiarsi a un tratto di sequenza interno alla regione amplificata dai primers, in condizioni idonee a condurre una reazione PCR,
3. aggiunta di una DNA polimerasi stabile al calore con attività 5'-3' esonucleasica e successiva amplificazione del frammento del gene hTERT;
4. misurazione della fluorescenza prodotta.

La quantità relativa di DNA presente nel campione in esame può essere facilmente ottenuta dai valori di fluorescenza rilevati, mediante interpolazione di una curva di calibrazione ottenuta con quantità note di DNA.

Secondo una realizzazione preferita, i primers e probes sono progettati in modo da amplificare il frammento 13059-13156 del gene hTERT (GenBank accession n. AF128893).

La metodica descritta, nota come real-time PCR, può essere eseguita in automatico utilizzando l'apparecchiatura GeneAmp 5700 Detection System (Applied Biosystem), che permette un'accurata amplificazione quantitativa del DNA attraverso il monitoraggio ottico continuo della reazione di PCR fluorogenica, arrivando a quantificare fino a 1 genoma-equivalente, pari a 6pg di DNA genomico.

Il metodo di quantificazione del DNA circolante secondo l'invenzione può essere utilizzato per la diagnosi precoce, la prognosi o il monitoraggio clinico di pazienti affetti da diversi tipi di tumori, inclusi il tumore del colon-retto, testa-collo, fegato e pancreas, in particolar modo il tumore del polmone. Può inoltre essere applicato alla determinazione del rischio o probabilità di sviluppo di tumore in individui sani esposti a fattori di rischio ambientali o legati ad abitudini personali quale, nel caso del cancro polmonare, il fumo di sigarette. Un incremento di DNA nel plasma di questi soggetti può essere indicativo di un rischio aumentato e quindi dovrebbe spingere a ripetere l'esame su un prelievo di plasma indipendente e, confermato il rialzo, a più accurati e specifici esami clinici e strumentali.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Si è trovato un metodo semplice e accurato per determinare la presenza di malattia tumorale o per valutare il rischio associato allo sviluppo di malattia tumorale, mediante quantificazione del DNA presente nel plasma utilizzando la tecnica real-time PCR. Più precisamente è stata messa a punto una metodica di quantificazione del DNA circolante mediante monitoraggio ottico continuo di una reazione PCR fluorogenica condotta su un campione di plasma utilizzando come inneschi (primers) e sonde (probes) oligonucleotidi



che si appaiano alla sequenza del gene della trascrittasi inversa di telomerasi umana (hTERT). La velocità di amplificazione di hTERT è stata usata come indicatore della quantità totale di DNA presente nel campione in esame.

La metodica è stata convalidata in uno studio allargato caso-controllo (200 individui) che ha coinvolto pazienti ai quali era stato diagnosticato un cancro al polmone in fase iniziale, seguiti poi nel follow-up con determinazione dei livelli di DNA plasmatico in prelievi successivi alla rimozione del tumore, e individui sani forti fumatori appaiati per età, sesso e abitudine al fumo. I risultati di questo studio dimostrano che 1) la metodica utilizzata ha un'alta specificità e sensibilità, come evidenziato dalle curve AUC ROC (valore globale: 0.94, intervallo 0.907-0.973), 2) nei pazienti, compresi quelli con tumore molto iniziale (stadio IA), i valori di DNA circolante nel plasma sono circa 8 volte superiori a quelli riscontrati negli individui sani, 3) nei pazienti monitorati durante il follow-up dopo rimozione chirurgica del tumore, si osservano livelli di DNA che si riducono rapidamente fino a raggiungere un valore simile a quello osservato negli individui che si mantengono sani; al contrario un aumento fino a 20 volte si è osservato nei pazienti che al controllo clinico sono risultati avere una ripresa del tumore o metastasi.

Anche se i valori più alti di sensibilità (90%), specificità (86%), PPV (90%) e NPV (90%) sono stati ottenuti con una concentrazione di DNA pari a 9 ng/ml, gli intervalli di confidenza intorno a questi indicatori diagnostici si sovrappongono a quelli di concentrazioni adiacenti. La scelta di un cut-off ottimale deve pertanto tenere conto di tale variabilità. Il valore di 25 ng/ml è l'unico dove la sensibilità non sia sovrapposta ad altri valori di cut-off,

sebbene la sensibilità sia piuttosto bassa (46%, 95% ci=36%, 56%).

Il valore degli OR (Odd Ratios) osservati dimostra la forte associazione tra la concentrazione di DNA plasmatico e il rischio di NSCLC, nonostante gli ampi limiti di confidenza. Simili valori OR non sono mai stati riportati in precedenza per nessun marcatore biologico e possono pertanto risultare di notevole beneficio nella pratica clinica.

L'aumento della quantità di DNA circolante è stato osservato in campioni provenienti da tumori a diversi stadi di avanzamento e di diversa grandezza. Ciò è particolarmente importante per le piccole lesioni, la cui identificazione sistematica potrebbe aiutare a ridurre la morbidità e mortalità da cancro polmonare.

Un aspetto importante dell'analisi quantitativa secondo l'invenzione è la possibilità di seguire cambiamenti longitudinali dopo resezione del tumore. I dati raccolti da 35 pazienti mostravano una rapida diminuzione dei valori di DNA circolante dopo resezione del polmone. Al contrario, nessuna diminuzione o livelli crescenti di DNA nel plasma identificavano individui con recidiva (24.7 ng/ml contro 7.1 ng/ml in pazienti senza tumore, $p=0.002$), suggerendo che la quantificazione del DNA nel plasma secondo l'invenzione rappresenta un nuovo approccio al monitoraggio di pazienti sottoposti a chirurgia o alla valutazione dell'efficacia della chemio- o radio-terapia.

Per valutare la possibile modulazione del rilascio di DNA libero dopo esposizione al fumo, si sono analizzati 20 non-fumatori sopra i 55 anni, trovando una concentrazione media di DNA circolante pari a 0.61 ng/ml. La stessa analisi condotta sul gruppo di individui ad alto rischio dello studio caso-controllo (forti fumatori di età superiore a 50 anni, con esposizione al

fumo >20 pacchi/anno) ha mostrato un valore medio di 4.6 ng/ml. Questi risultati indicano che i livelli di DNA plasmatico in individui non esposti al fumo sono molto bassi.

Nel complesso i risultati degli studi clinici mostrano l'efficacia del metodo di quantificazione del DNA circolante secondo l'invenzione nella diagnosi precoce del tumore al polmone in soggetti ad alto rischio, in particolare in forti fumatori.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1. Diagrammi di amplificazione di real-time PCR quantitativa per hTERT in DNA di plasma da pazienti NSCLC (A) e campioni di controllo (B). La quantità relativa di DNA del plasma è molto maggiore nei campioni dei pazienti (diagrammi di sinistra) rispetto ai controlli (diagrammi di destra). Il calcolo delle quantità di DNA del plasma è basato sul numero dei cicli dove la fluorescenza di ciascuna reazione supera la soglia (CT) che è posta nella fase geometrica di amplificazione al di sopra del background. L'asse X indica il numero dei cicli di reazione PCR quantitativa. L'asse Y indica il log di intensità di fluorescenza rispetto al background (ΔRn).

Figura 2. Diagrammi a "box" della concentrazione di DNA nel plasma nei casi NSCLC e nei corrispondenti controlli. Il box è delimitato sotto e sopra dai percentili 25% e 75%, la mediana è la linea intera nel box, le barre degli errori inferiore e superiore indicano il 90% dei valori. Mini = minimo valore rivelato, max = massimo valore rivelato, sd = deviazione standard.

Figura 3. Curve ROC per la diagnosi di NSCLC usando valori di DNA plasmatico. Curva e area sotto la curva (AUC) valutata usando la procedura logistica in SAS (Cary, NC).

PARTE SPERIMENTALE

Materiali e metodi

Casistica e controlli

Sono stati valutati 100 casi consecutivi di cancro al polmone non a cellule piccole (NSCLC), 81 uomini e 19 donne, non precedentemente sottoposti a chemio-radioterapia e inclusi nella Banca dei Tessuti dell'Istituto Europeo di Oncologia (IEO) dal 2000 al 2001. Per ciascun caso è stato scelto un controllo corrispondente per sesso, età e abitudini di fumo.

L'età media \pm deviazione standard era di 65,1 \pm 8,9 anni nei casi e di 64,1 \pm 8,2 nei controlli, la durata media del fumo era 40,5 \pm 10,9 anni nei casi e 41,7 \pm 9,5 nei controlli. La popolazione comprendeva 7 coppie di casi-controlli di non fumatori. I controlli per i 93 forti fumatori sono stati scelti tra i partecipanti al programma di diagnosi precoce dell'IEO la cui TAC spirale si era dimostrata negativa. I controlli non fumatori sono stati reclutati da donatori di sangue sani presso l'Unità di Immunoematologia dell'Istituto. Il numero di precedenti fumatori differiva leggermente tra i casi e i controlli (28 casi e 11 controlli).

Un caso di fumatore occasionale molto leggero (meno di 5 sigarette al giorno) è stato assimilato a un non fumatore. Una differenza media all'interno della coppia di 1 anno di età era statisticamente significativa ($p < 0,02$), suggerendo la necessità di aggiustare per età nell'analisi del DNA plasmatico come fattore di rischio.

Raccolta dei campioni e isolamento del DNA

Un campione di 7,5 ml di sangue periferico è stato raccolto con EDTA da pazienti prima dell'intervento chirurgico e da controlli al momento



dell'esame TAC spirale, e conservato a -140° . La separazione del plasma e l'estrazione del DNA sono state effettuate come precedentemente riportato (25). Il DNA purificato da 1 ml di plasma è stato diluito in un volume finale di 50 μ l di acqua. L'analisi del DNA di plasma è stata condotta senza conoscere lo stato di caso/controllo.

Quantificazione del DNA nel plasma

Per quantificare il DNA circolante nel plasma si è utilizzato un approccio di PCR quantitativa "real-time" basato sul metodo del nucleotide 5'. Questa metodologia è basata sul monitoraggio continuo di una PCR fluorogenica progressiva attraverso un sistema ottico (28, 29). Il sistema PCR utilizza due primers di amplificazione e una sonda di ibridizzazione aggiuntiva, amplicone-specifica e fluorogenica la cui sequenza bersaglio è localizzata internamente all'amplicone.

La sonda è marcata con due coloranti fluorescenti. Uno serve come reporter all'estremità 5' (VICTM colorante). Il suo spettro di emissione è spento da un secondo colorante fluorescente all'estremità 3' (TAMRA). Quando avviene l'amplificazione, l'attività di esonucleasi 5'-3' della polimerasi di DNA AmpliTaq[®] taglia il reporter dalla sonda durante la fase di estensione rilasciandolo così dal quencher (30). Il risultante aumento di emissione fluorescente del colorante reporter viene monitorato durante il processo di PCR.

I primers e probes sono stati progettati per amplificare specificamente il gene ubiquitario di interesse a singola copia Trascriptasi Inversa di Telomerasi umana (hTERT) mappato su 5p15.33. Le dimensioni dell'amplicone del gene hTERT era di 98 bp (posizione 13059-13156, di

GenBank n. AF128893). Le sequenze dei primers e del probe erano le seguenti: primer forward: 5'-GGC ACA CGT GGC TTT TCG-3'; primer reverse: 5'-GGT GAA CCT CGT AAG TTT ATG CAA-3'; probe: VIC5'-TCA GGA CGT CGA GTG GAC ACG GTG-3' TAMRA.

Le PCR fluorogeniche sono state condotte in un volume di reazione di 50 µl con uno strumento GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystem, Foster City, CA). La sonda fluorogenica e i primers sono stati sintetizzati dalla Applied Biosystems. Ciascuna miscela di reazione PCR consisteva in: 25 µl di TaqMan® Universal Master Mix Applied Biosystem; 0,67 µl di donda [15 mM]; 0,45 µl di primers forward [10 mM]; 0,45 µl di primer inverso [10 mM]; 18,43 µl di acqua sterile. 5 µl di soluzione di DNA sono stati usati in ciascuna reazione di PCR real-time. Il ciclo termico è stato iniziato con un primo passaggio di denaturazione a 50° per 2 min. e poi a 95°C per 10 min. Il profilo termico della PCR era 95°C per 15 min e 60°C per 1 min. Sono stati analizzati i dati ottenuti durante 50 cicli di amplificazione.

Le amplificazioni sono state effettuate in piastre da 96 pozzetti in uno strumento GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystem). Ciascuna piastra conteneva campioni dei pazienti in triplicato e campioni multipli di bianchi con acqua come controllo negativo. Per la costruzione della curva di calibrazione di ciascuna piastra è stato usato un TaqMan Control Human Genomic DNA standard a 10 µg/ml (Applied Biosystem) con opportune diluizioni seriali a 50 ng, 5 ng, 2,5 ng, 0,5 ng, 250 pg, 50 pg e 10 pg. In ciascun esperimento è stata ottenuta un'amplificazione lineare fino all'ultimo punto di diluizione di 10 pg di DNA bersaglio (Coefficiente di correlazione 0,999-0,995; tendenza 3,25-3,35).

Tutti i dati sono stati analizzati con il software Sequence Detection System dell'Applied Biosystem per interpolare la curva di amplificazione standard del DNA a quantità note con i CT di amplificazione dei campioni bersaglio in esame ottenendo così la quantità relativa di DNA nel campione.

Per lo studio di follow-up, tutti i campioni di plasma consecutivi per ciascun paziente sono stati analizzati simultaneamente nello stesso esperimento di real-time PCR per permettere la quantificazione comparativa dei campioni durante il periodo di osservazione.

Metodiche di patologia e immunoistochimica

Dati clinico-patologici erano disponibili per tutti i casi. Vi erano 58 adenocarcinomi, 34 ccrinomi a cellule squamose, 3 carcinomi a cellule larghe, 3 carcinomi pleomorfi, e 2 carcinomi adenosquamosi. Secondo la classificazione WHO dell'adenocarcinoma polmonare (31), 19 (32,6%) mostravano il modello di crescita ad acini, 19 papillari, 17 (29,3%) solido e 3 (5,2%) bronchioalveolari. Secondo il sistema di suddivisione in stadi del cancro al polmone, lo stadio del tumore era pT1 nel 18%, pT2 nel 55%, pT3 nel 21% e pT4 nel 6%; 47% dei pazienti erano pN0, 20% pN1 e 33% pN2 o N3. Lo stadio I rendeva conto per il 34%, IIB 25%, IIIA 33%, e IIIB/IVB 8%. In tre casi l'analisi è stata condotta solo su metastasi nodali mediastine.

In ciascun caso, la comparsa sia di necrosi tumorali sia di infiltrato linfoide è stata valutata semiquantitativamente su una scala da assente a 2+ (1+ se $\leq 50\%$, e 2+ se $> 50\%$ dell'intero tumore). Per l'analisi immunoistochimica, i campioni chirurgici fissati in formalina e racchiusi in paraffina sono stati analizzati per i marcatori correlati ad apoptosi cellulare (53) e di crescita tumorale (CD-117, Ki-67, e densità microvasale), secondo metodi messi a punto

precedentemente (33). Tutti i casi sono stati valutati in cieco senza conoscere l'identità dei pazienti, la diagnosi patologica, l'esito clinico o lo stato del DNA plasmatico. La percentuale di cellule tumorali p53, EGFR-, CD117- e Ki-67-immunoreattive è stata valutata assegnando un punteggio minimo a 1000 cellule tumorali in campi rappresentativi da immunocolorazione. La neoangiogenesi tumorale è stata dedotta dalla immunocolorazione con CD34 di cellule endoteliali come descritto in precedenza (34).

Metodi statistici

La distribuzione dei valori di DNA ha rivelato un allontanamento dalla normalità che veniva mitigato usando una trasformazione logaritmica. Il log della concentrazione è stato usato per scopi di analisi, tuttavia valori non trasformati sono stati usati per riportare i risultati.

I rapporti di probabilità (OR Odds ratios) e i corrispondenti intervalli di confidenza al 95% sono stati calcolati usando la regressione logistica condizionale in SAS (Cary, NC, USA) per valutare il DNA del plasma come fattore di rischio per NSCLC. Una curva caratteristica "receiver-operating" (ROC) è stata costruita per valutare la capacità diagnostica delle concentrazioni di DNA nel plasma. Ciascun valore di DNA unico è stato usato come "cut-point" per calcolare i valori di sensibilità e specificità che definiscono la curva e l'area sotto la curva (AUC). Gli errori standard sono stati stimati separatamente come descritto in van der Schouw (35) in modo da ottenere un intervallo di confidenza del 95% per l'area.

Nei casi, la possibile associazione tra la concentrazione di DNA e i parametri clinici e patologici continui è stata valutata calcolando i coefficienti di correlazione di Pearson's e Spearman's in base alla distribuzione dei



parametri (età e distribuzione del marcatore EGFR). Il confronto delle concentrazioni medie di DNA del plasma nei pazienti con i dati di follow-up è stato fatto usando il test Kruskal-Wallis.

Risultati

Analisi quantitativa del DNA plasmatico circolante in pazienti tumorali e nei controlli

La Figura 1 mostra i diagrammi di amplificazione dell'intensità di fluorescenza contro il ciclo PCR di campioni di plasma di pazienti tumorali e dei rispettivi controlli. Ciascun grafico corrisponde alla quantità di DNA bersaglio iniziale presente nel campione. Le curve di amplificazione spostate a destra, che rappresentano una quantità di DNA bersaglio ridotta, discriminano chiaramente i controlli dai pazienti tumorali. La distribuzione della concentrazione di DNA nel plasma nei casi e nei corrispondenti controlli descrive due distinte popolazioni di valori a parte alcune sovrapposizioni (Figura 2). La concentrazione mediana nei casi (24,3 ng/mL) era quasi otto volte il valore rilevato nei controlli (3,1 ng/mL). Concentrazioni molto alte sono state osservate solo nei casi, mentre all'altro estremo della distribuzione vi erano pochi casi con concentrazioni molto basse di DNA (0,5 ng/mL). E' stata osservata una variabilità di DNA circolante maggiore nei casi che nei controlli (figura 2).

Concentrazione di DNA nel plasma come fattore di rischio per NSCLC

Una concentrazione elevata di DNA circolante nel plasma è stata associata a un maggior rischio di NSCLC. La stratificazione di terzili mostrava che il rischio aumentava esponenzialmente quando venivano comparati soggetti con concentrazioni plasmatiche nel secondo e terzo terzile con quelli nel primo terzile usando una regressione logistica condizionale

(fino a 85 volte, Tabella 1). Quando analizzati come continuo, un aumento unitario del DNA del plasma (ng/mL) era associato a un aumento del 21% del rischio di NSCLC (OR=1,21, 95% CI=1,11, 1,31). La concentrazione di DNA circolante era associata all'età nei casi (coefficiente d'età quando veniva regredito il log della concentrazione plasmatica=0,029, errore standard=0,013, $p=0,026$). Nessuna associazione è stata osservata tra i livelli di DNA nel plasma e la durata o l'intensità del fumo.

Efficacia diagnostica del saggio real-time PCR quantitativo

L'area sotto la curva ROC mostrata nella figura 3 era 0,94 (intervallo di confidenza del 95% 0,907-0,973) suggerendo un forte potere discriminativo del saggio molecolare. In Tabella 2 sono mostrati alcuni "cut-points" della concentrazione di DNA usati per generare la curva con sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e valore predittivo negativo. Gli intervalli di confidenza al 95% intorno alle stime di sensibilità erano sovrapposti tra le concentrazioni successive mostrate in Tabella 2, con l'eccezione delle ultime due concentrazioni (20 e 25 ng/mL).

Correlazione dei livelli di DNA nel plasma con le caratteristiche clinico-patologiche

Tra i marcatori morfologici e immunoistochimici analizzati si è osservata un'associazione significativa con l'espressione di EGFR e con la densità microvasale (tabella 3). Il marcatore di proliferazione Ki67 aumentava all'aumentare della concentrazione di DNA plasmatico, anche se la correlazione non era statisticamente significativa ($p=0,15$). L'età era il solo parametro clinico significativamente associato al rilascio di DNA nel plasma. Non si è osservata associazione tra i livelli di DNA nel plasma e necrosi,

infiltrazione linfoide o crescita.

Cambiamento nei livelli di DNA nel plasma durante il follow-up

In 35 dei 100 pazienti con tumore analizzati per la quantità di DNA nel plasma prima dell'intervento chirurgico per tumore di stadio I-II, è stato ottenuto un secondo campione di plasma e analizzato per monitorare cambiamenti nei livelli di DNA durante il follow-up clinico da 3 a 15 mesi dopo l'intervento chirurgico (tempo medio di osservazione 8 mesi). La concentrazione mediana complessiva di DNA nei campioni di plasma nel follow-up era di 8,4 ng/ml, mostrando una chiara tendenza verso la riduzione se paragonata ai livelli di base mediani di 24,5 ng/ml ($p < 0,0001$). Confrontando questi pazienti in base al loro stato clinico, la concentrazione mediana di DNA nel follow-up era significativamente inferiore in 30 individui senza malattie rispetto ai 5 pazienti con tumore recidivo (7,1 ng/mL contro 24,7 ng/mL; $p = 0,002$).

Tabella 1. *Concentrazione di DNA nel plasma come fattore di rischio per NSCLC*

	Casi N=100	Controlli N=100	Odds Ratio Condizionale *	95% CI
Distribuzione in terzili del DNA in ng/mL †				
≤4	4	62	1 ‡	
4,1 – 20	27	36	5,5	(1,9 – 16,3)
>20	69	2	85,5	(16,5 – 445)

* Aggiustata per l'età

† Ottenuta dalla distribuzione raggruppata di valori di DNA nel plasma nei casi e nei controlli

‡ Gruppo di riferimento

Tabella 2. Efficacia di screening della concentrazione di DNA plasmatico

Cut-point (ng/mL)*	Sensibilità	95% CI†	Specificità	95% CI†	PPV	NPV
4	97	91,5 – 99,4	60	49,7 – 69,7	71	95
7	92	84,8 – 96,5	77	67,5 – 84,8	80	91
10	88	80,0 – 93,6	86	77,6 – 92,1	88	88
15	78	68,6 – 85,7	95	88,7 – 98,4	94	81
20	69	58,9 – 77,9	98	93,0 – 99,8	97	76
25	79	35,9 – 56,3	99	94,5 – 100	98	65

PPV=valore predittivo positivo, NPV= valore predittivo negativo

* Concentrazioni contrastanti inferiori al cutpoint contro concentrazioni uguali o maggiori al valore specificato

† Stime di sensibilità e specificità sono state trattate come parametri binomiali per calcolare intervalli di confidenza del 95% usando Statxact (Cambridge, MA)

Tabella 3. Correlazione della concentrazione di DNA nel plasma con parametri clinici e patologici

	Log (Concentrazione di DNA)				
	Età	Anni di fumo	Log MVD	Ki67	Egfr
Coefficiente*	0,22	0,04	0,25	0,15	0,2†
Valore p	0,026	0,71	0,016	0,15	0,044
n‡	100	93	97	97	97

* Coefficienti di correlazione di Person's

† Coefficiente di correlazione di Spearman's

‡ Dimensione del campione ridotto a 93 casi di fumatori (attuali o pregressi) e a 97 casi con campioni di tumore primario



RIVENDICAZIONI

1. Metodo per la quantificazione del DNA in un campione di plasma di un paziente neoplastico, di un soggetto con sospetta neoplasia o a rischio di sviluppo di neoplasia, che comprende:

- 1) l'estrazione del DNA dal campione in esame;
- 2) l'aggiunta alla preparazione di DNA di a) una miscela di oligonucleotidi di innesco (primers) idonei all'amplificazione PCR di un frammento del gene della trascrittasi inversa di telomerasi umana (hTERT), e di b) un oligonucleotide sonda (probe), recante almeno un fluoroforo "quencher" e uno "reporter" alle estremità 3' e 5', in grado di appaiarsi a un tratto di sequenza interno al frammento amplificato dai primers,
in condizioni idonee a condurre una reazione PCR,
- 3) l'aggiunta di una DNA polimerasi stabile al calore con attività 5'-3' esonucleasica e amplificazione del frammento del gene hTERT;
- 4) misurazione della fluorescenza prodotta.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la quantità di DNA presente nel campione è determinata attraverso l'interpolazione di una curva di calibrazione ottenuta con quantità note di DNA.

3. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detto frammento del gene della trascrittasi inversa di telomerasi umana (hTERT) corrisponde alla regione 13059-13156 della sequenza depositata in GenBank n. AF128893.

4. Metodo secondo la rivendicazione 1, attuato con lo strumento GeneAmp© 5700 Detection System.

5. Metodo secondo le rivendicazioni 1-4, per la diagnosi precoce, la

prognosi o il monitoraggio clinico di pazienti affetti da tumore.

6. Metodo secondo le rivendicazioni 1-4, per la valutazione del rischio o probabilità di comparsa di tumore in soggetti sani o in soggetti appartenenti a famiglie con caratteristiche di ereditarietà a cancro.

7. Metodo secondo la rivendicazione 6, in cui i soggetti sani sono esposti a fattori di rischio ambientali o legati ad abitudini personali.

8. Metodo secondo la rivendicazione 7, in cui il fattore di rischio è il fumo.

9. Metodo secondo le rivendicazioni 5-6, in cui detto tumore è un tumore del polmone, colon-retto, testae collo, fegato o pancreas.

10. Metodo secondo la rivendicazione 9, in cui detto tumore è un carcinoma polmonare con o senza metastasi.

Milano, 23 dicembre 2002

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

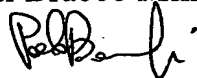
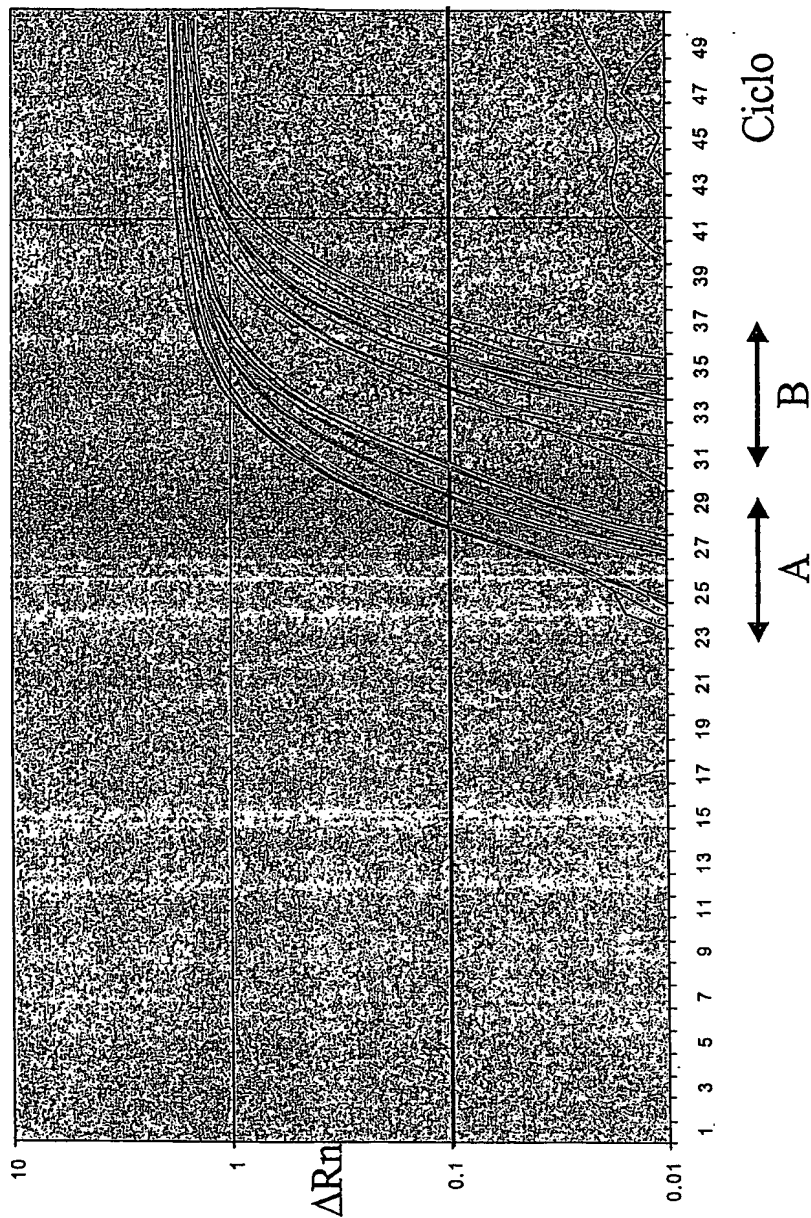


FIGURA 1



MI 2002A 0 02743

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Handwritten signature

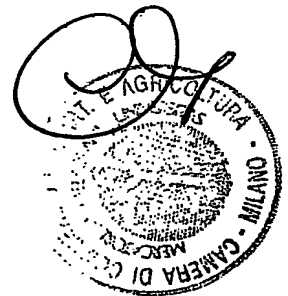
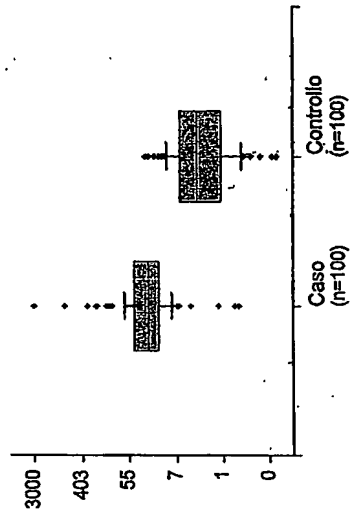


FIGURA 2



Distribuzione percentuale della concentrazione di DNA nel plasma in ng/mL dallo stato della malattia

	mini	10°	25°	mediana	75°	90°	max	media	sd
caso	0,1	0,4	1,1	3,1	6,3	11,1	27	4,6	5
controllo	0,5	9	15,8	24,3	43,7	65,9	3010	75*	310*

* valori esclusi 2 outliers (823 e 3010 ng/mL).



MI 2002A 002743

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

[Handwritten signature]

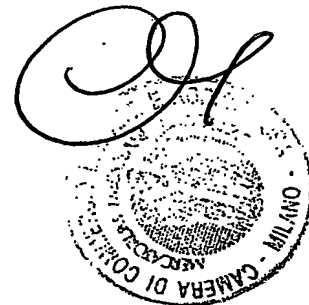
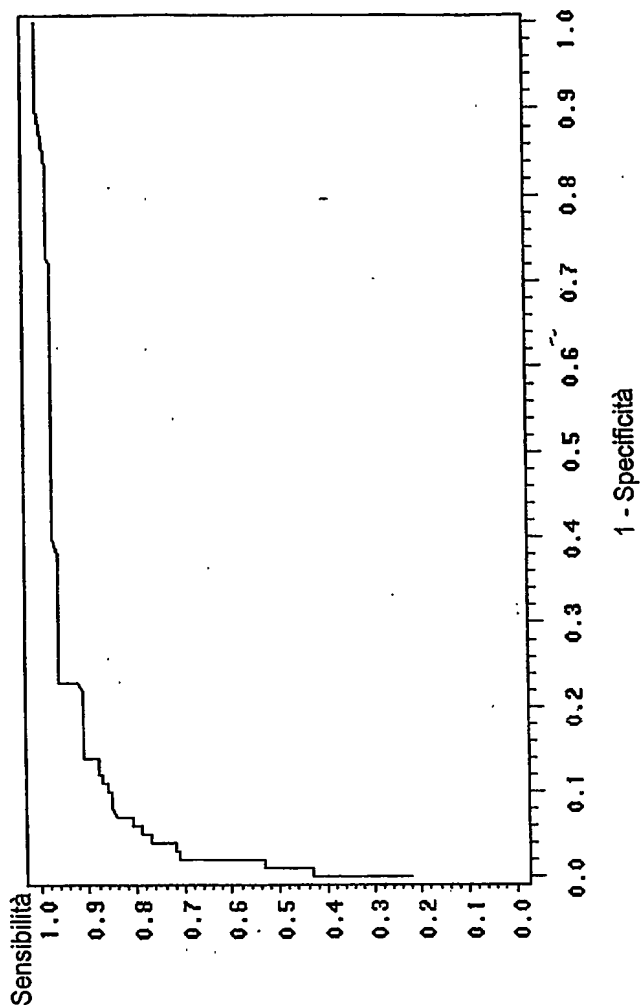


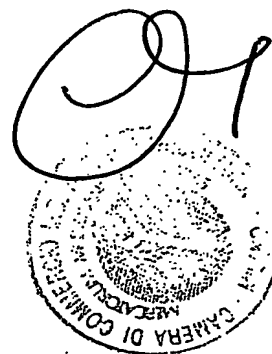
FIGURA 3



MI 2002 A 0 0 2 7 4 3

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Banfi Paolo



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.